

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)(51) Internationale Patentklassifikation⁶ :C12N 15/86, 15/37, 15/62, C07K 14/025,
A61K 31/70, 39/12, 48/00 // 45/05

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 98/05790**

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

12. Februar 1998 (12.02.98)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE97/01629

(22) Internationales Anmeldedatum:

30. Juli 1997 (30.07.97)

(30) Prioritätsdaten:

196 31 357.0

2. August 1996 (02.08.96)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):

DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM

STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS (DE/DE);

Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KLEINSCHMIDT, Jürgen

[DE/DE]; Weihwiesenweg 5, D-69245 Bammental (DE).

JOCHMUS, Ingrid [DE/DE]; Bismarckstrasse 60, D-69168

Schriesheim (DE). GISSMANN, Lutz [DE/DE]; Pirolweg 1,

D-69168 Wiesloch (DE). MÜLLER, Martin [DE/US]; 1351

N-Hoyne, Chicago, IL 60622 (US).

(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger

Strasse 246, D-81825 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE,
CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, SE).

Veröffentlicht

*Mit internationalem Recherchenbericht.**Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen
Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen
eintreffen.*(54) Title: VECTOR FOR ACTIVATING THE IMMUNE SYSTEM AGAINST CELLS ASSOCIATED TO PAPILLOMA VIRUSES OR
SEQUENCES THEREOF(54) Bezeichnung: VEKTOR ZUR AKTIVIERUNG DES IMMUNSYSTEMS GEGEN MIT PAPILLOMVIREN BZW. SEQUENZEN
DAVON ASSOZIIERTEN ZELLEN

(57) Abstract

A vector is disclosed for a nucleic acid which codes for a fusion polypeptide which includes a papilloma virus (poly)peptide and a non-transforming (poly)peptide coded by an early papilloma virus gene. Also disclosed is a vaccination agent which contains such a vector and the use of the vector and vaccination agent.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft einen Vektor mit einer für ein Fusionspolypeptid kodierenden Nukleinsäure, wobei das Fusionspolypeptid ein strukturelles Papillomvirus-(Poly)peptid und ein nicht-transformierendes, durch ein frühes Papillomvirus-Gen kodiertes (Poly)peptid umfaßt. Ferner betrifft die Erfindung ein einen solchen Vektor enthaltendes Vakzinierungs-Mittel und die Verwendung beider.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CN	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Vektor zur Aktivierung des Immunsystems gegen mit Papillomviren bzw. Sequenzen davon assoziierten Zellen

Die vorliegende Erfindung betrifft einen Vektor, der sich zur Aktivierung des Immunsystems gegen mit Papillomviren bzw. Sequenzen davon assoziierten Zellen eignet, ein einen solchen Vektor enthaltendes Vakzinierungs-Mittel und die Verwendung beider.

5

Papillomviren infizieren das Epithelgewebe von Mensch und Tier. Human-Papillomviren (HPVs) finden sich in benignen, z.B. Warzen, Kondylome im Genitalbereich, und malignen, z. B. Karzinome der Haut und der Gebärmutter, epithelialen Neoplasmen. Auch werden HPVs für die Entwicklung maligner Tumoren des Respirationstrakts in Betracht gezogen. Ferner werden HPVs für die Entwicklung squamöser Karzinome der Lunge als zumindest mitverantwortlich angesehen.

10

Papillomviren weisen ein ikosaedrisches Capsid ohne Hülle auf, in dem ein zirkuläres, doppelsträngiges DNA-Molekül von etwa 7900 bp vorliegt. Das Capsid umfaßt ein Hauptcapsid-Protein (L1) und ein Nebencapsid-Protein (L2). Ersteres wird durch den offenen Leserahmen L1 (L1-ORF) und letzteres durch L2-ORF kodiert. L1 oder L1 und L2 führen in vitro zur Ausbildung von Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs). Die Transformationsfähigkeit von Papillomviren wird den Proteinen E6 und E7 zugeschrieben. Diese werden durch E6-ORF bzw. E7-ORF kodiert.

15

20

Viele Versuche wurden unternommen, das Immunsystem gegenüber Zellen zu stimulieren, die mit Papillomviren bzw. Sequenzen davon assoziiert sind. Bisher haben diese Versuche jedoch keine zufriedenstellenden Ergebnisse gebracht.

25

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem das Immunsystem aktiviert werden kann, Zellen, insbesondere Tumorzellen, zu erkennen und auszuschalten, die mit Papillomviren bzw. Sequenzen davon assoziiert sind.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Vektor mit einer für ein Fusionspolypeptid kodierenden Nukleinsäure, wobei das Fusionspolypeptid ein strukturelles Papillomvirus-(Poly)peptid und ein nicht-transformierendes, durch ein frühes Papillomvirus-Gen kodiertes (Poly)peptid umfaßt.

10 Der Ausdruck "Vektor" umfaßt jeglichen Vektor, der sich für einen Gentransfer, d.h. das Einführen von Nukleinsäuren in Zellen, eignet. Der Vektor kann in den Zellen episomal verbleiben oder in das Genom integriert werden. Ferner kann der Vektor ein Plasmid- oder ein Virus-Vektor sein. Beispiele eines Virus-Vektors sind retrovirale, Adenovirus-, Vacciniavirus- oder Adeno-assoziierte Virus (AAV)-Vektoren, wobei letztere bevorzugt sind. Ein AAV-Vektor kann in Wildtyp- oder
15 veränderter Form vorliegen. Auch kann er nur solche Sequenzen, wie ITR-Sequenzen, umfassen, die für seine Transduktionsfähigkeit notwendig sind. Günstig kann es aber auch sein, wenn er zusätzlich solche Sequenzen, wie rep-Sequenzen, umfaßt, die ihm die Integration in das Chromosom 19 ermöglichen. Ein Virus-Vektor kann als Virus-Partikel oder in Form seiner Nukleinsäure vor-
20 liegen. Bevorzugt ist es, wenn der Virus-Vektor replikationsdefekt ist.

Der Ausdruck "Papillomvirus" umfaßt jegliche Papillomviren oder Sequenzen davon, die mit Zellen, insbesondere Tumorzellen assoziiert sein können. Insbesondere können es HPVs und ganz besonders "high risk" HPVs, wie HPV16,
25 18, 33, 35 und 45, sein.

Der Ausdruck "Nukleinsäure" umfaßt jegliche Nukleinsäure, wie DNA und/oder RNA, die für ein Fusionspolypeptid kodiert, das ein strukturelles Papillomvirus-(Poly)peptid und ein nicht-transformierendes, durch ein frühes Papillomvirus-Gen
30 kodiertes (Poly)peptid umfaßt. Günstig ist es, wenn die Nukleinsäure exprimierbar ist. Besonders günstig ist es, wenn sie unter der Kontrolle eines konstitutiven oder induzierbaren Promotors, wie eines Gewebe- oder Tumor-spezifischen

Promotors steht.

5 Der Ausdruck "strukturelles Papillomvirus-(Poly)peptid" umfaßt jegliches Peptid bzw. Polypeptid eines Papillomvirus, das für die Struktur des Papillomvirus zumindest mitverantwortlich ist. Insbesondere wird ein solches (Poly)Peptid durch L1-ORF oder L2-ORF eines Papillomvirus bzw. durch einen Teil dieser kodiert. Besonders bevorzugt ist ein (Poly)peptid, das als VLP vorliegen kann.

10 Der Ausdruck "ein nicht-transformierendes, durch ein frühes Papillomvirus-Gen kodiertes (Poly)peptid" umfaßt jegliches Peptid bzw. Polypeptid, das durch ein frühes Papillomvirs-Gen, insbesondere E1-, E2-, E4-, E5-, E6 oder E7-ORF bzw. durch einen Teil dieses kodiert und nicht-transformierend ist. Der Ausdruck "nicht-transformierend" weist darauf hin, daß das (Poly)peptid von Natur aus oder durch ein Eingreifen keine Transformationsfähigkeit besitzt. Ein bevorzugtes
15 (Poly)peptid wird durch E6- oder E7-ORF eines Papillomvirus bzw. durch einen Teil dieses kodiert.

20 Der Ausdruck "Fusionspolypeptid" weist darauf hin, daß das strukturelle Papillomvirs-(Poly)peptid und das nicht-transformierende, durch ein frühes Papillomvirus-Gen kodierte (Poly)peptid in jeglicher Kombination in dem Fusionspolypeptid vorliegen können. Auch können die einzelnen (Poly)peptide von verschiedenen Papillomviren stammen. Vorzugsweise ist der C-Terminus des strukturellen (Poly)peptids mit dem N-Terminus des nicht-transformierenden (Poly)peptids verbunden. Ferner kann es von Vorteil sein, wenn das nicht-transformierende
25 (Poly)peptid innerhalb des strukturellen (Poly)peptids lokalisiert ist. Ein bevorzugtes Fusionspolypeptid umfaßt ein durch HPV 16 L1-ORF kodiertes (Poly)peptid und ein durch HPV16 E6- bzw. E7-ORF kodiertes (Poly)peptid. Ferner wird ein Fusionspolypeptid bevorzugt, das ein durch HPV 18 L1-ORF kodiertes (Poly)peptid und ein durch HPV 18 E6- bzw. E7-ORF kodiertes (Poly)Peptid
30 umfaßt.

Zur Herstellung eines vorstehenden Vektors können übliche Verfahren durch-

geführt werden. Beispielsweise kann ein AAV-Vektor als Virus-Partikel wie folgt hergestellt werden: An das 3'-Ende des HPV 16 L1-ORF wird das 5'-Ende des HPV 16 E6-ORF ligiert. Zuvor wurde ein Teil des E6-ORF deletiert, wodurch die transformierenden Eigenschaften von E6 zerstört wurden. Das DNA-Fragment L1-ORF-E6-ORF wird in einen AAV-Vektor inseriert, der die 5'- und 3'-ITR-Sequenzen von AAV, nicht aber die für die AAV-Rep und -Cap-Proteine kodierenden Sequenzen enthält. Die Insertion erfolgt zwischen den beiden ITR-Sequenzen. Das DNA-Fragment L1-ORF-E6-ORF steht unter der Kontrolle eines bezüglich AAV heterologen Promotors. Der erhaltene AAV-Vektor wird in Zellen transfiziert, welche die AAV-Rep und -Cap-Proteine exprimieren. Ferner werden die Zellen mit einem Helfer-Virus, z.B. Adenovirus, infiziert, wodurch der AAV-Vektor als Virus-Partikel erhalten wird.

Mit einem vorstehenden Vektor kann das Immunsystem aktiviert werden, Zellen, insbesondere Tumorzellen, zu erkennen und auszuschalten, die mit Papillomviren bzw. Sequenzen davon assoziiert sind. Dies kann prophylaktisch und in einer Therapie erreicht werden. Hierzu werden Zellen des betreffenden Organismus, wie Antigen-präsentierende Zellen, z.B. dendritische Zellen, B-Zellen, Makrophagen und/oder mit Papillomviren bzw. Sequenzen davon assoziierte Tumorzellen bzw. Prä-Tumorzellen mit dem Vektor transduziert. Die Transduktion kann durch übliche Verfahren erfolgen. Liegt der Vektor als Virus-Partikel vor, ist es günstig, die Zellen mit diesen zu infizieren. Liegt er andererseits als Nukleinsäure, z.B. DNA, vor, ist es angeraten, die Zellen mit dieser zu transfizieren. Als Transfektionstechniken sind z.B. Elektroporation, Lipofektion und Partikel-Kanone zu nennen. Die Zellen können in dem Organismus vorliegen. Andererseits können die zu transduzierenden Zellen auch aus dem Organismus isoliert, außerhalb des Organismus transduziert und dann wieder in den Organismus zurückgeführt werden. Solche Zellen werden als autologe Zellen bezeichnet. Des weiteren können hinsichtlich des Organismus auch allogene Zellen zur Transduktion verwendet werden. Hierbei ist es günstig, wenn diese Zellen einem dem Organismus entsprechenden HLA-Typ angehören. Der Fachmann kennt Verfahren, Zellen einen bestimmten HLA-Typ zu verleihen. Weiterhin ist es günstig, wenn

bei einem vorstehenden Verfahren die Tumorzellen oder Prä-Tumorzellen vor ihrer Rückführung in den Organismus inaktiviert werden. Hierfür können übliche Verfahren, wie Bestrahlung, durchgeführt werden.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vakzinierungs-Mittel, das einen vorstehenden Vektor und übliche Hilfsstoffe, wie Puffer, Verdünnungsmittel, Trägermittel, etc. umfaßt. Günstig kann es sein, wenn das Vakzinierungs-Mittel weitere Substanzen enthält, die das Immunsystem, z.B. gegen Tumorzellen, aktivieren können. Solche Substanzen können insbesondere MHC-
10 1-Moleküle, kostimulatorische Moleküle, z.B. B7, und sekretorische Immunstimulatoren, z.B. Zytokine, wie IL-2, IL-12, Interferon und GM-CSF, sein. Die Substanzen können z.B. in Form von Peptiden, insbesondere synthetischen Peptiden, vorliegen. Auch können die Substanzen in Form von sie kodierenden Expressionsplasmiden vorliegen, die ferner für HLA-Moleküle kodieren können.
15 Besonders günstig ist es, wenn das Vakzinierungs-Mittel auch die durch den Vektor transduzierten Zellen enthält. Für die Zellen gelten vorstehende Ausführungen. Handelt es sich um Tumor- oder Prä-Tumorzellen, ist es günstig, wenn die Zellen inaktiviert sind.
- 20 Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, das Immunsystem gegen Zellen zu aktivieren, die mit Papillomviren bzw. Sequenzen davon assoziiert sind. Diese Zellen können Tumorzellen bzw. Prä-Tumorzellen sein. Die Aktivierung des Immunsystems kann prophylaktisch und in der Therapie erfolgen. Die vorliegende Erfindung stellt einen neuen Schritt dar, über eine in vivo bzw. ex vivo
25 Gentherapie schwerste Erkrankungen zu therapieren.

Die Erfindung wird durch das nachfolgende Beispiel erläutert.

30 **Beispiel:** Herstellung eines Vektors, der für ein HPV16 L1-E7 Fusionspolypeptid kodiert

Von einem genomischen HPV16 Klon (vgl. Kirnbauer et al, (1993), 6929-6936)

- wurde der L1-ORF durch eine PCR-Reaktion amplifiziert. Hierzu wurden L1-spezifische Primer verwendet, die am 5'-Ende eine zusätzliche Bgl II-Restriktionsstelle aufweisen. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde mit Bgl II gespalten und in die BamHI-Restriktionsstelle des üblichen Vektors pUC19 inseriert. Durch spezifische Mutagenese wurde an der Position 7051 des L1-ORF eine EcoRV-Restriktionsstelle, gefolgt von einem Translationsstopcodon (TAA) eingeführt. Damit wurde erreicht, daß der L1-ORF für ein L1 kodiert, dem die letzten 34 Aminosäuren fehlten.
- 10 In einer weiteren PCR-Reaktion wurde jener Teil des E7-ORF von HPV16 amplifiziert, der für die ersten 50 Aminosäuren von E7 kodiert. Die verwendeten Primer enthielten an ihrem 5'-Ende eine EcoRV-Restriktionsstelle. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in die EcoRV-Restriktionsstelle vorstehenden pUC19 Vektors inseriert, der für das verkürzte L1 kodiert. Somit wurde ein L1-E7 Fusionsgen erhalten. Dieses wurde über XbaI/SmaI in den üblichen Baculovirus-Vektor pVL1392 inseriert. Von diesem wurde das L1-E7 Fusionsgen durch NotI/SmaI herausgeschnitten und in die NotI-Restriktionsstelle des AAV-Vektors pUF2 (vgl. Zolotukhin et al., J. Virol. 70, (1996), 4646-4654) inseriert. Es wurde ein Vektor erhalten, der für ein HPV16 L1-E7 Fusionspolypeptid kodiert.
- 15 20 Virale Partikel des Vektors wurden gemäß üblicher Verfahren erhalten (vgl. Rolling and Samulski, Molecular Biotechnology 3, (1995), 9-15).

Patentansprüche

1. Vektor mit einer für ein Fusionspolypeptid kodierenden Nukleinsäure, wobei das Fusionspolypeptid ein strukturelles Papillomvirus-(Poly)peptid und ein nicht-transformierendes, durch ein frühes Papillomvirus-Gen kodiertes (Poly)peptid umfaßt.
5
2. Vektor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Papillomvirus ein HPV ist.
3. Vektor nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das HPV ausgewählt ist aus HPV 16, 18, 33, 35 und 45.
10
4. Vektor nach einem der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor ein Virus- oder ein Plasmid-Vektor ist.
5. Vektor nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Virus-Vektor ein AAV-, retroviraler, Adenovirus- oder Vacciniavirus-Vektor ist.
15
6. Vektor nach einem der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure unter der Kontrolle eines konstitutiven oder induzierbaren Promotors steht.
20
7. Vektor nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Promotor ein Gewebe- oder Tumor-spezifischer Promotor ist.
8. Vektor nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß das strukturelle Papillomvirus-(Poly)peptid durch L1-ORF bzw. durch einen Teil davon kodiert ist.
25
9. Vektor nach einem der Ansprüche 1 - 8, dadurch gekennzeichnet, daß das

nicht-transformierende, durch ein frühes Papillomvirus-Gen kodierte (Poly)peptid durch E6-ORF oder E7-ORF bzw. durch einen Teil dieser kodiert ist.

- 5 10. Vakzinierungs-Mittel, enthaltend den Vektor nach einem der Ansprüche 1 - 9 und übliche Hilfsstoffe.
11. Vakzinierungs-Mittel nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß weitere das Immunsystem aktivierende Substanzen vorliegen.
- 10 12. Vakzinierungs-Mittel nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor in Zellen vorliegt.
- 15 13. Vakzinierungs-Mittel nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen Papillomviren bzw. Sequenzen davon assoziierte Tumorzellen und/oder Prä-Tumorzellen sind.
14. Vakzinierungs-Mittel nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen und die Prä-Tumorzellen inaktiviert sind.
- 20 15. Verwendung des Vektors nach einem der Ansprüche 1 - 9 und des Vakzinierungsmittels nach einem der Ansprüche 10 - 14 zur Aktivierung des Immunsystems gegen mit Papillomviren bzw. Sequenzen davon assoziierten Zellen.

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 97/01629

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/86 C12N15/37 C12N15/62 C07K14/025 A61K31/70
A61K39/12 A61K48/00 //A61K45/05

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 96 11272 A (MEDIGENE GES FUER MOLEKULARBIO ;GISSMANN LUTZ (US); ZHOU JIAN (US)) 18 April 1996 see page 7, line 12 - line 17 see page 12, line 33 - page 13, line 22; claims 8-11,36-44,55 ---	1-15
Y	WO 92 16636 A (IMMUNOLOGY LTD) 1 October 1992 see the whole document, particularly page 9, line 8 - line 10 --- -/-	1-11,15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 November 1997

Date of mailing of the international search report

- 2. 12. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mandl, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DE 97/01629

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see supplemental sheet CONTINUATION OF INFORMATION PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6 4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/DE 97/01629

remark : although claim 15 refers to a method of treating human and animal bodies, the search was made based on the indicated effects of the compound concerned.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 97/01629

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 94 21808 A (GENENTECH INC ;BOEHRINGER INGELHEIM INT (DE); BIRNSTIEL MAX L (AT)) 29 September 1994 see page 6, paragraph 4 - page 8, paragraph 2 see page 14, paragraph 1 see page 15, paragraph 3 ---	12-14
A	ZOLOTUKHIN S. ET AL.: "A 'humanized' green fluorescent protein cDNA adapted for high level expression in mammalian cells." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 70, no. 7, July 1996, pages 4646-4654, XP002047302 cited in the application see page 4646, right-hand column, last paragraph - page 4647, left-hand column, line 34; figure 2 ---	1-15
A	WO 96 00583 A (MERCK & CO INC ;DONNELLY JOHN J (US); LIU MARGARET A (US); MARTINE) 11 January 1996 see the whole document -----	1-11,15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Application No

PCT/DE 97/01629

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9611272 A	18-04-96	DE 4435907 A	11-04-96
		DE 19526752 A	23-01-97
		AU 4270196 A	02-05-96
		DE 29521486 U	30-04-97

WO 9216636 A	01-10-92	AU 665531 B	11-01-96
		AU 1414792 A	21-10-92
		BR 9205771 A	07-06-94
		CA 2106069 A	15-09-92
		CN 1064892 A	30-09-92
		EP 0576471 A	05-01-94
		JP 6505626 T	30-06-94

WO 9421808 A	29-09-94	AT 399656 B	26-06-95
		DE 4326821 A	18-05-95
		AT 55693 A	15-11-94
		AU 6427994 A	11-10-94
		CA 2158655 A	29-09-94
		CN 1119459 A	27-03-96
		CZ 9502417 A	17-04-96
		EP 0689604 A	03-01-96
		FI 954383 A	18-09-95
		HU 73383 A	29-07-96
		JP 8507921 T	27-08-96
		NO 953684 A	18-09-95
		NZ 263550 A	20-12-96
		PL 311036 A	22-01-96

WO 9600583 A	11-01-96	AU 2694595 A	25-01-96
		EP 0768893 A	23-04-97
		FI 965224 A	27-12-96
		HU 76446 A	29-09-97
		NO 965590 A	28-02-97
		PL 317874 A	28-04-97
		SK 164196 A	06-08-97
ZA 9504641 A	26-01-96		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen
PCT/DE 97/01629

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/86 C12N15/37 C12N15/62 C07K14/025 A61K31/70
A61K39/12 A61K48/00 //A61K45/05

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 96 11272 A (MEDIGENE GES FUER MOLEKULARBIO ;GISSMANN LUTZ (US); ZHOU JIAN (US)) 18.April 1996 siehe Seite 7, Zeile 12 - Zeile 17 siehe Seite 12, Zeile 33 - Seite 13, Zeile 22; Ansprüche 8-11,36-44,55 ---	1-15
Y	WO 92 16636 A (IMMUNOLOGY LTD) 1.Oktober 1992 siehe das ganz Dokument, besonders Seite 9, Zeile 8 - Zeile 10 ---	1-11,15
	--- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen
- * A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- * E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- * L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- * O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- * P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- * T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis der Erfindung zugrundeliegenden Prinzipien oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- * X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- * Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- * Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. November 1997

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

- 2. 12. 97

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 eponi,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Mandl, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/DE 97/01629

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>WO 94 21808 A (GENENTECH INC ;BOEHRINGER INGELHEIM INT (DE); BIRNSTIEL MAX L (AT)) 29.September 1994 siehe Seite 6, Absatz 4 - Seite 8, Absatz 2 siehe Seite 14, Absatz 1 siehe Seite 15, Absatz 3 ---</p>	12-14
A	<p>ZOLOTUKHIN S. ET AL.: "A 'humanized' green fluorescent protein cDNA adapted for high level expression in mammalian cells." JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 70, Nr. 7, Juli 1996, Seiten 4646-4654, XP002047302 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 4646, rechte Spalte, letzter Absatz - Seite 4647, linke Spalte, Zeile 34; Abbildung 2 ---</p>	1-15
A	<p>WO 96 00583 A (MERCK & CO INC ;DONNELLY JOHN J (US); LIU MARGARET A (US); MARTINE) 11.Januar 1996 siehe das ganze Dokument -----</p>	1-11,15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 97/01629

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erweisen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
 weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
 siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr.
 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
 daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
 weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE 97/01629

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Bemerkung : Obwohl sich Anspruch 15 auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. Aktenzeichen

PCT/DE 97/01629

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9611272 A	18-04-96	DE 4435907 A	11-04-96
		DE 19526752 A	23-01-97
		AU 4270196 A	02-05-96
		DE 29521486 U	30-04-97
WO 9216636 A	01-10-92	AU 665531 B	11-01-96
		AU 1414792 A	21-10-92
		BR 9205771 A	07-06-94
		CA 2106069 A	15-09-92
		CN 1064892 A	30-09-92
		EP 0576471 A	05-01-94
		JP 6505626 T	30-06-94
WO 9421808 A	29-09-94	AT 399656 B	26-06-95
		DE 4326821 A	18-05-95
		AT 55693 A	15-11-94
		AU 6427994 A	11-10-94
		CA 2158655 A	29-09-94
		CN 1119459 A	27-03-96
		CZ 9502417 A	17-04-96
		EP 0689604 A	03-01-96
		FI 954383 A	18-09-95
		HU 73383 A	29-07-96
		JP 8507921 T	27-08-96
		NO 953684 A	18-09-95
		NZ 263550 A	20-12-96
		PL 311036 A	22-01-96
WO 9600583 A	11-01-96	AU 2694595 A	25-01-96
		EP 0768893 A	23-04-97
		FI 965224 A	27-12-96
		HU 76446 A	29-09-97
		NO 965590 A	28-02-97
		PL 317874 A	28-04-97
		SK 164196 A	06-08-97
		ZA 9504641 A	26-01-96